

Experimentelle Untersuchungen  
über den Einfluß von  $\text{CO}_2$   
auf die Fettsäuresynthese in vitro

Dietz von Stetten

1960



Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN  
ÜBER DEN EINFLUSS VON  $\text{CO}_2$   
AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE IN VITRO

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Dietz v. Stetten  
aus  
Aystetten

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Referent: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. Dr. Eyer

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 10. 60



## I. EINLEITUNG

### 1. Die Beziehungen zwischen Fettsynthese, Glykolyse und Atmung

Im Mittelpunkt des Intermediärstoffwechsels stehen eine Reihe von Reaktionen, die erstmals von Krebs im Zitronensäurezyklus zusammengefaßt wurden. Über die "aktivierte Essigsäure" münden die Kohlenhydrate, die Fette und die Eiweißstoffe in diesen gemeinsamen Reaktionskreis zur endgültigen Verbrennung.

Ein Teil dieser in den Krebszyklus fließenden Essigsäure entstammt dem im Wesentlichen von Embden und Mayernhof aufgeklärten glykolytischen KH<sup>1)</sup>-Abbau, der ausgehend von der Phosphorylierung von Glukose durch ATP unter Mitwirkung von Hexokinase anaerob zur Bildung von Milchsäure bzw. Äthylalkohol, aerob zu Brenztraubensäure und durch deren oxydative Decarboxylierung zu Essigsäure führt (22). Von den einzelnen Zwischenreaktionen ist für unsere Betrachtung vor allem die Umwandlung von Phosphor-Glycerin-Aldehyd in 1, 3-Diphosphor-Glycerinsäure wichtig. Die Phosphorylierung erfolgt hier, im Gegensatz zu den übrigen Phosphorylierungen während der Glykolyse, mit anorganischem Phosphat, das als solches im weiteren Abbau nicht mehr freigesetzt wird. Der gleichzeitig bei dieser Reaktion durch Dehydrierung freierwerdende Wasserstoff wird von DPN aufgenommen, es entsteht DPNH (6).

Neben diesem Embden-Mayernhof-Abbau der Glukose wurde in neuerer Zeit von Horecker u. a. ein zweiter Abbaupfad als sog. "glucose-phosphate-shunt" beschrieben. Sein Anteil an der gesamten Glykolyse

#### 1) Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

KH - Kohlenhydrate

ATP (ADP, AMP) = Adenosin-tri-(di-, mono-)-phosphat

TPN (DPN) = Tri-(Di-)-phosphor-pyridinnucleotid

CoA = Coenzym-A

ZF = WARBURG'sches Zwischenferment

scheint nicht sehr hoch, er ist hier aber insofern wesentlich, als er TPN<sup>1)</sup> zu TPNH reduziert. Beide, DPNH wie TPNH sind nicht nur für die WARBURG'sche Endoxydation, sondern auch für die Fettsäuresynthese von großer Bedeutung (4).

Wird die aus der Glykolyse stammende Brenztraubensäure nicht zu Essigsäure decarboxyliert, sondern nach der Reaktion von Wood-Werkman (16) carboxyliert, so entsteht Oxalessigsäure, welche für den Start des Zitronensäurezyklus unbedingt benötigt wird. Dabei kondensieren sich "aktivierte Essigsäure" und Oxalessigsäure zu Zitronensäure. Diese wird im weiteren Verlauf des Zyklus wieder zu Oxalessigsäure abgebaut und kann nun von neuem mit "aktivierter Essigsäure" reagieren. Bei diesem stufenweisen Abbau der Zitronensäure werden an zwei Stellen CO<sub>2</sub> und insgesamt vier Moleküle H<sub>2</sub> freigesetzt. Die CO<sub>2</sub> entweicht, der Wasserstoff gelangt über DPNH bzw. TPNH zur Endoxydation und bildet somit jeweils den Ausgangspunkt einer Atmungskette. Über die WARBURG'schen Atmungsfermente erfolgt die Elektronenabgabe an den molekularen Sauerstoff und letztlich die Verbindung von 2 H<sup>+</sup> und O<sup>2-</sup> zu H<sub>2</sub>O. Mit der hierbei freiwerdenden Energie wird in der sog. Atmungsphosphorylierung ATP aufgebaut, vorausgesetzt, daß anorganisches Phosphat und ADP bzw. AMP vorhanden ist. Als wichtigste energiereiche Verbindung ist ATP für alle Energie-verbrauchenden Prozesse im Intermediärstoffwechsel, das heißt auch für alle Auf- und Umbaureaktionen direkt oder indirekt von wesentlicher Bedeutung.

Nach der Entdeckung (1) und Strukturentklärung (2) des Coenzym-A, gelang es Lynen, die "aktivierte Essigsäure" mit der Acetyl-CoA-Verbindung zu identifizieren. Das wirksame Prinzip dieser Energie-reichen Verbindung besteht in der freien SH-Gruppe des Cysteaminanteils des CoA, die sich in Form einer Acyl-Mercaptan-Bindung mit einem Acyl-Rest unter Verbrauch von einem ATP pro Mol verbinden und unter Bildung eines ATP pro Mol wieder spalten kann (3). Der Autor konnte weiter zeigen, daß die sog. "aktivierten Fettsäuren" ebenfalls CoA-

---

1) Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

ATP (ADP, AMP) = Adenosin-tri-(di-, mono-)-phosphat

TPN (DPN) = Tri-(DI-)-phosphor-pyridinnucleotid

CoA = Coenzym-A

ZF = WARBURG'sches Zwischenferment

Verbindung darstellen und daß sie nur in dieser Form zu reagieren vermögen. Das immer wiederkehrende Reaktionsprinzip im Fettsäureabbau wie in der Fettsäuresynthese wurde von ihm geklärt und im "Fettsäurezyklus" zusammengefaßt (4). Ausgehend von zwei Molekülen Acetyl-CoA bildet sich in einer ersten Reaktion unter Einfluß von  $\beta$ -Ketothiolase Acetacetyl-CoA. Der zweite Schritt besteht in einer Hydrierung von Acetacetyl-CoA zu  $\beta$ -Oxybutyryl-CoA. Den hierfür benötigten Wasserstoff liefert DPNH, welches zu DPN dehydriert wird. In der dritten Stufe entsteht durch Wasserabspaltung Crotonyl-CoA, dessen Doppelbindung in einer letzten Reaktion schließlich durch TPNH (5) zu Butyryl-CoA hydriert wird. Die so erreichte Verlängerung von Acetyl-CoA um zwei C-Atome kann bei mehrmaligem Durchlaufen des Fettsäurezyklus bis auf die Länge der höheren Fettsäuren fortgesetzt werden. Beim Abbau der Fettsäuren durchlaufen diese als CoA-Verbindungen den Fettsäurezyklus in umgekehrter Richtung bis zur Stufe von Acetyl-CoA, welches nun mit Oxalessigsäure reagieren, also in den Zitronensäurezyklus eintreten kann.

Viele Beobachtungen, vor allem der letzten Zeit sprechen eindeutig dafür, daß es zwischen den einzelnen Stoffwechselgebieten außer dem Zitronensäurezyklus, dem ATP und dem Coenzym-A noch andere Verbindungen gibt.

Die ersten Feststellungen dieser Art macht Pasteur bei Untersuchungen über den glykolytischen Zuckerabbau, die ergaben, daß unter aeroben Bedingungen wesentlich weniger Zucker verbraucht wird als anaerob, d.h. daß mit zunehmender Atmung die Glykolyse zurückgeht. Diese als Pasteur-Effekt bezeichnete Abhängigkeit der Glykolyse von der Atmung hat nach Lynen (6) ihre Ursache darin, daß sowohl Atmung wie Glykolyse sich in frei vorliegendes anorganisches Phosphat und in ADP teilen müssen. Während sich ADP aus ATP mit Glukose und Hexokinase immer wieder regenerieren kann, würde ein gleichzeitiger starker Verbrauch von Phosphat durch Atmung und Glykolyse das Gleichgewicht zwischen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen stören und die Phosphatreserve aufbrauchen. Das Prinzip der Steuerung von Atmung und Glykolyse besteht also in einem Gleichgewicht zwischen anorganischem Phosphat und gebundenem Phosphat: "Die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung, die in direkter Beziehung zum Energieverbrauch der Lebensvorgänge steht, kann auf diese Weise die energieliefernde Dissimilation regulieren und in Übereinstimmung mit dem Bedarf bringen" (6).

Bei Untersuchungen über die Ursache der schon vorher vielfach mitgeteilten Beobachtung, daß die Fettsäuresynthese in Leberhomogenaten von Diabetes- oder Hungerratten gegenüber der Norm stark vermindert ist, stellten Helmreich et al. (7) fest, daß der DPN/DPNH-Quotient, der in den Lebern gesunder Tiere ungefähr 3 : 1 beträgt, sich bei Lebern diabetischer Tiere auf 10 : 1 verschiebt und im Hunger noch höher ansteigt. Sie folgerten daraus eine Abhängigkeit der Fettsäuresynthese von der Höhe des DPNH-Angebots, da nach Lynen der Fettsäurezyklus hydrierte Pyridinnucleotide nicht entbehren kann. Da im Verlauf der normalen Glykolyse bei der Triosephosphat-Dehydrierung DPNH gebildet wird, erklärt sich, daß eine Verminderung der Glykolyse eine verminderte Fettsäuresynthese zur Folge hat. Das gleichzeitige Ansteigen der Ketokörper im Hunger oder bei Diabetes, welches meist auf einen Mangel an Oxalessigsäure durch die Störung der Glykolyse zurückgeführt wurde, ist nach Ansicht dieser Autoren ein weiterer Ausdruck für den Mangel an hydrierten Pyridinnucleotiden und damit für den Stop der Fettsäuresynthese beim Acetacetyl-CoA. Mit diesen Ergebnissen stimmen auch die Befunde von v. Brand und Helmreich (8) überein. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die Zugaben von DPN in ein gleichzeitig atmendes und glykolysierendes Leberhomogenat die Fettsynthese durch eine Glykolysesteigerung anzuheben vermochte, während anaerob nur die hydrierte Form von DPN eine Erhöhung des Acetateinbaues in höhere Fettsäuren brachte. Nach den Veröffentlichungen von Siperstein und Fagan (9) ist nicht das DPNH, sondern das TPNH der die Fettsynthese bei verminderter Glykolyse eigentlich limitierende Faktor. TPNH entsteht beim Zuckerabbau über den "Glucose-phosphate-shunt" und wird im Fettsäurezyklus zur Hydrierung von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA benötigt (5). Da der Anteil dieses direkten Glukoseabbaues an der gesamten Glykolyse an sich schon gering ist, muß sich nach Ansicht der genannten Autoren eine Verminderung der Glykolyse auf den TPNH-Spiegel und damit auf die Fettsäuresynthese auswirken, bevor noch ein Mangel an DPNH auftreten kann.

## 2. Problemstellung

Vorausgegangene experimentelle Untersuchungen über die Fettsäuresynthese unter aeroben Bedingungen und Messungen über die Atmung eines fettsäure-synthetisierenden Fermentsystems aus Taubenlebern führten zu Ergebnissen, die nur zum Teil aus der Art der angewandten Zusätze und aus den jeweiligen Versuchsbedingungen (aerob/anaerob) erklärt werden konnten. So ergab z.B. die Inkubation einer Fermentlösung bei geöffneten WARBURG-Trögen eine viel geringere Ausbeute an aus Acetat synthetisierten höheren Fettsäuren, als die Inkubation im geschlossenen System unter ebenfalls aeroben Bedingungen. Weiter zeigten Versuchsansätze, bei denen zunächst eine Bestimmung der Atmung vorgenommen worden war, einen geringeren Acetateinbau in höhere Fettsäuren, als Vergleichsansätze, bei denen keine Atmungsmessungen erfolgt waren.

Es lag nun die Annahme nahe, daß das  $\text{CO}_2$  hier in irgend einer Weise eine Rolle spielen könnte, da in beiden Fällen u.a. die  $\text{CO}_2$ -Abgabe aus der Enzymlösung gegenüber den Kontrollen erleichtert sein dürfte: im einen Fall bei geöffneten Trögen durch die Möglichkeit des freien Entweichens von  $\text{CO}_2$  in die Luft, im anderen durch die ständige Absorption der im Intermediärstoffwechsel entstehenden  $\text{CO}_2$  an NaOH (Bestimmung der Atmung nach Warburg).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, diese Annahme in vitro experimentell zu prüfen, das heißt die Auswirkungen einer Veränderung des  $\text{CO}_2$ -Druckes auf den Intermediärstoffwechsel und hier speziell auf die Fettsäuresynthese und den ATP-Haushalt zu untersuchen.

Um einen Anhaltspunkt über die Vergleichbarkeit der täglich neu zubereiteten Fermentpräparationen zu erhalten, wurde bei fast allen Versuchsreihen in einem Ansatz die Steigerung der Fettsäuresynthese durch Zugabe von  $\text{Mn}^{++}$  bestimmt.

## II. EXPERIMENTELLER TEIL

### 1. Versuche zur Fettsäuresynthese

Nach den Angaben von Brady und Gurin (10) sind Lebern reichlich mit Kohlenhydraten gefütterter Tauben für Versuche zur Fettsäuresynthese besonders geeignet, da sie die Fermente der Fettsynthese, der Glykolyse und der Atmung in ausreichender Menge enthalten. Es wurden hier Tauben, die mindestens drei Tage gut mit Weizenkörnern gefüttert waren, verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte im Wesentlichen nach den Vorschriften dieser Autoren.

#### Praeparation des Enzymsystems

Nach Decapitation der Tiere werden die Lebern entnommen und sofort in Eiswasser gelegt. Makroskopisch auffällige Organe (Ikterus, Tumortastasen) scheiden von der Weiterverarbeitung aus. Nach der Reinigung von Bindegewebe werden die mit Filterpapier getrockneten Lebern grob zerkleinert, gewogen und versetzt mit Puffer <sup>1)</sup> im Verhältnis 1:1,5 in drei bis vier kleineren Portionen gleichmäßig nach Potter-Elvehjem homogenisiert.

Dieses Homogenat wird zunächst 45 min bei 2000 U/min zentrifugiert, der gewonnene Überstand nochmals mit Puffer soweit verdünnt, daß 4 ml letztlich einer Ausgangsmenge von 3 g Leber entsprechen und weitere 75 min bei 25000 U/min zentrifugiert. Da eine Ultrazentrifuge nicht zur Verfügung stand, konnte dieser letzte Überstand nicht vollständig von Mitochondrien und Mikrosomen gereinigt werden. Das gewonnene Enzymsystem enthält die löslichen Fettsäure-synthetisierenden Fermente und die Enzyme der Glykolyse und der Atmung. Alle beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen bei 0 °C.

#### Inkubation

In einem WARBURG-Trog von 20 ml Volumen werden neben 2,3 ml des Enzympraeparates die notwendigen Cofaktoren von insgesamt 0,6 ml einpipettiert.

---

1) 0,085m  $K_2HPO_4$ , 0,009m  $KH_2PO_4$ , 0,07m  $KHCO_3$  zu gl. Teil pH 7,4

### Genaue Zusammensetzung der Reaktionslösung:

|                                                                 |         |
|-----------------------------------------------------------------|---------|
| 0,1 ml $MgCl_2$                                                 | 0,006 m |
| 0,1 ml Na-Citrat                                                | 0,01 m  |
| 0,4 ml $1\text{-}^{14}C\text{-Acetat}$ ( $\sim 110000$ Imp/min) | 0,008 m |
| 2,3 ml Enzympreparat                                            |         |

je nach Versuchsordnung:

0,1 ml  $MnCl_2$  bzw.  $H_2O$

---

3,0 ml Gesamtvolumen, pH = 7,2

Die Gasphase ist aerob (Luft) oder anaerob (Argon). Das Reaktionsgemisch wird drei Stunden bei 32 °C im WARBURG-Apparat inkubiert.

### $CO_2$ -Absorption

Für die Fettsäuresynthese-Versuche unter  $CO_2$ -Absorption wird in den Mitreiszylinder des WARBURG-Gefäßes ein mit 0,2 ml 2N NaOH getränkter Filterpapierstreifen eingelegt.

### $CO_2$ -Begasung

Vor Beginn der Inkubation wird während 10 min die Reaktionslösung mit reiner  $CO_2$  begast. Bei den Versuchen mit  $^{14}CO_2$  werden 16 mg  $^{14}C$  markierten Bariumcarbonat (= 0,1 mCi) zusammen mit 14 mg inaktiven Bariumcarbonat in den Randvult eines Spezialtroges eingebracht. Die durch tropfenweise Zugabe von 12 %iger Salzsäure im geschlossenen System entstehende  $^{14}CO_2$  entweicht nach Durchströmen des WARBURG-Kolbens letztlich gegen einen leichten Druck in eine kleine Waschflasche, in der sie durch 20 %ige NaOH gebunden wird. Bei diesen Versuchen wird an Stelle von  $^{14}C\text{-Acetat}$  inaktives Acetat in entsprechender Menge dem Versuchsansatz beigegeben.

Alle WARBURG-Gefäße werden vor der Inkubation geschlossen und zu Beginn zum Druckausgleich noch einmal kurz geöffnet.

### Isolierung der synthetisierten $^{14}C$ -Fettsäuren

Nach Beendigung der Inkubation wird der Inhalt eines WARBURG-Gefäßes mit 7 ml aqua bidest in ein Rundkolbchen von 50 ml Volumen übergeschüttet und zusammen mit 5 ml 30 %iger alkoholischer KOH und 25 mg Palmitinsäure unter ständigem Rückfluß über vier Stunden verestert. Nach

dem Abkühlen wird die Lösung in einem Scheidetrichter zusammen mit ca. 20 ml Petroläther durch Zusatz von 20 %iger HCl bis zu Umschlag des Indikators Bromkresylgrün-Metnylorange leicht angesäuert. Darauf werden die Fettsäuren durch viermaliges Ausschütteln mit Petroläther aus dem Verseifungsgemisch extrahiert und nach dem Eindampfen schließlich auf 10 ml aufgefüllt.

### Bestimmung der Radioaktivität

Der Methode von Entenman et al. folgend wird 1 ml des Petrolätherauszuges auf ein mit "Lenspaper" belegtes Aluminiumplättchen mit Rand ( $\varnothing = 25$  mm) aufgetropft. Mit dem Verdunsten des Petroläthers setzen sich die darin gelösten Fettsäuren gleichmäßig auf dem Lenspaper ab, ihre Radioaktivität kann nun im Geigerzähler direkt bestimmt werden. Von jedem Versuchsansatz werden 4 Plättchen gegossen und mit einem  $\beta$ -Fensterzählrohr dünner Belegung ( $1 \text{ mg/cm}^2$ ) bei konstanter Spannung und gleichem geometrischem Abstand gemessen, die 4 Werte gemittelt. Als Vergleichsbasis für die üblichen Korrekturen der Meßwerte dient eine  $^{14}\text{C}$ -Standardfolie. Alle Ergebnisse sind auf  $2,5 \times 10^4$  Imp/min dieser Vergleichsfolie umgerechnet.

### 2. Der Gehalt an höheren Fettsäuren und die ATP-Konzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Grundsätzlich verlaufen diese Versuche genauso wie die eben beschriebenen. Ein Unterschied zu diesen besteht in der Menge der inkubierten Reaktionslösung - alle Komponenten werden je um  $1/3$  der obigen Menge erhöht, Endvolumen also 4 ml statt 3 ml - und in der Dauer der Inkubation. Diese wird von 10 min über 20, 40, 80, 120 bis 180 min gestaffelt. Jeweils zu diesen Zeitpunkten werden zwei Ansätze (Test- und Kontrollansatz) aus dem WARBURG-Apparat genommen, je 1 ml der Reaktionslösung abpipettiert, die verbleibenden 3 ml in der beschriebenen Art weiterverarbeitet und die Höhe der Fettsäuresynthese bestimmt. Der zurückbehaltene 1 ml der Reaktionsmischung wird zur Bestimmung des ATP-Gehalts verwendet.

## Die Bestimmung des ATP-Gehalts

### Theoretische Erläuterungen

Bei der von Warburg und Kornberg angegebenen Methode zur ATP-Bestimmung handelt es sich um einen indirekten optischen Test, in dessen Verlauf im Eppendorf-Photometer die Zunahme der Absorptionsbande von TPNH gemessen wird. Sie beruht im Prinzip auf zwei gekoppelten Reaktionen:

- 1)  $\text{ATP} + \text{Glukose} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glukose-6-ph} + \text{ADP}$
- 2)  $\text{Glukose-6-ph} + \text{TPN} \xrightarrow{\text{Z.F.}} \text{6-Phosphoglukons.} + \text{TPNH} + \text{H}^+$

Das nach Gleichung 1) aus ATP und Glukose unter Hexokinase-Einfluß entstehende Glukose-6-ph wird unter Mitwirkung des WARBURG'schen Zwischenferments zu 6-Phosphoglukonsäure dehydriert (Gleichung 2). Diese Reaktion verläuft nur bei Zugabe von TPN als Wasserstoffakzeptor, wobei TPNH entsteht. Pro Mol aufgespalteten ATP's entsteht ein Mol TPNH. Ist alles ATP verbraucht, so sistiert auch die TPNH-Bildung. Die Zunahme der Absorptionsbande des TPNH bei  $334 \text{ m}\mu$  im Eppendorf-Photometer ist ein quantitatives Maß für die Höhe des ATP-Gehalts der Testlösung.

### Praktische Durchführung

Sofort nach Entnahme aus dem WARBURG-Trog werden je 1 ml Reaktionslösung mit 1 ml kalter, 0,6n Perchlorsäure enteiweißt und 10 min bei  $0^\circ \text{C}$  und 25000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wird anschließend mit 0,5 n KOH langsam auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mindestens 15 min zum Absetzen der ausfallenden  $\text{KClO}_4$  im Eis stehen lassen.

Zur photometrischen Bestimmung des ATP-Gehalts werden nacheinander

4,00 ml Tri-Aethanol-Amin-Puffer, pH = 7,4

0,20 ml 0,1m Magnesiumchlorid-Lösung

0,45 ml 0,5m Glukose-Lösung

0,20 ml der zuvor vorsichtig dekantierten Testlösung

und 0,05 ml einer TPN-Lösung (2 mg TPN/1 ml aqua bidest)

in eine Meßküvette ( $d = 2 \text{ cm}$ ) einpipettiert und gut vermischt. Die nun im Photometer ablesbare Extinktion dieser Lösung wird als Ausgangswert festgehalten. Durch die Zugabe von 0,05 ml einer Hexokinase-Zwischen-

fermentlösung (15 mg Hexokinase + 2 mg ZF pro 1 ml aqua bidest) wird die Reaktion gestartet. Nach ungefähr 10 bis 15 min ist alles ATP verbraucht, die TPNH-Entstehung abgeschlossen. Von der Differenz zwischen Ausgangswert und Endwert wird die durch Nachstart ermittelte Eigenextinktion der Hexokinase-ZF-Lösung abgezogen und somit die Extinktionsdifferenz gewonnen.

### Berechnung des ATP-Gehaltes

Die Berechnung des ATP-Gehalts erfolgt nach einer von den genannten Autoren angegebenen Gleichung:

$$\frac{\Delta E \times 507 \times 4.95 \times \text{Vol}}{6.22 \times 2 \times 0.2 \times 1000} = \mu\text{ ATP/ml Testlösung}$$

Dabei entspricht

- E = Extinktionsdifferenz
- 507 = Molekulargewicht von ATP
- 4.95 = ml Gesamtinhalt der Küvette
- Vol = Volumen der enteiweißten und neutralisierten Reaktionslösung (1 ml Reakt.-Lösg. + 1 ml Perchlors. + ml KOH)
- 6.22 = molare Extinktion von ATP
- 2 = Schichtdicke der Testlösung im Strahlengang (cm)
- 0.2 = pro Küvette eingesetzte ATP-haltige Lösung
- 1000 = Multiplikator der Skalenwerte

Da hier außer  $\Delta E$  und Vol alle Werte konstant sind, läßt sich der ATP-Gehalt nach der einfachen Formel

$$\underline{1.0087 \times E \times \text{Vol} = \mu\text{ ATP/ml Testlösung}}$$

berechnen.

### Reagentien

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Natrium-Acetat, Harwell, Radiochemical Center, England  
 $^{14}\text{C}$ -Bariumcarbonat, Forschungsreaktor Göttingen, Isotopenlabor.  
Fermente: Praeparate der Firma C.F. Boehringer, Mannheim  
Alle übrigen verwendeten Substanzen sind p.A. -Praeparate der Firma Merck.

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Versuche zur Fettsäuresynthese

##### Der Einfluß von $Mn^{++}$

Daß  $Mn^{++}$  die Fettsäuresynthese eines in beschriebener Weise dargestellten Fermentsystems aus Taubenleber zu steigern vermag, ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden (11), (13). Nach den Angaben von Völk (12) wurde  $Mn^{++}$  in der optimalen Konzentration von  $0.338 \times 10^{-3} m$  als  $MnCl_2$  der Enzymlösung zugesetzt. Die hier erzielten Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen von Völk.

Von 75 Versuchen ergaben 5 eine geringe Hemmung des Acetateinbaus gegenüber den Kontrollversuchen, alle übrigen zeigten eine deutliche, unter den einzelnen Versuchen stark streuende Steigerung, zum Teil bis auf über das 6-fache des Ausgangswertes. Auch die von Völk beobachtete Abhängigkeit der prozentualen Steigerung von der Ausgangsaktivität des Fermentsystems bestätigte sich (Tabelle 1): mit zunehmender Ausgangsaktivität nimmt die prozentuale Aktivitätssteigerung durch  $Mn^{++}$  ab.

Tabelle 1

| Versuchs-<br>Anzahl | Ausgs. -Akt.<br>Imp $\cdot 10^4$ /min | %Steigerg.<br>durch $Mn^{++}$ |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 17                  | 0.0 - 0.5                             | 243                           |
| 25                  | 0.5 - 1.0                             | 92                            |
| 22                  | 1.0 - 2.0                             | 50                            |
| 11                  | über 2.0                              | 6                             |

Die prozentuale Steigerung der Fettsäuresynthese durch  $Mn^{++}$  bei verschiedener Ausgangsaktivität des Enzymsystems.

Die untereinander stark differierenden Ausgangsaktivitäten erschweren einen Vergleich der einzelnen Ergebnisse. Relativ gleichmäßig ist die prozentuale  $Mn^{++}$ -Förderung in einem Bereich von  $0.5 - 1.5 \cdot 10^4$  Imp/min Ausgangsaktivität, sie liegt hier zwischen ca. 70 und 100 %. Man

kann also annehmen, daß die biologischen Eigenschaften von Versuchsansätzen, deren Ausgangsaktivitäten in diesen Bereich fallen, untereinander, wenigstens grob vergleichbar sind, wenn gleichzeitig ein  $Mn^{++}$ -Effekt von 70 - 100 % Aktivitätssteigerung erreicht wird.

## CO<sub>2</sub>-Absorption und Fettsäuresynthese

Anlaß zu den folgenden Untersuchungen gab die Beobachtung, daß die Fettsäuresynthese bei Bestimmung der Sauerstoffaufnahme unseres Ferment-systems geringer ausfiel, als in Versuchsansätzen, deren Atmung nicht gemessen wurde, d.h. die keine NaOH zur Aufnahme der freiwerdenden CO<sub>2</sub> enthielten.

In 3 anaeroben und 7 aeroben Versuchsreihen wurden nebeneinander die Wirkung des Zusatzes von  $Mn^{++}$ , der CO<sub>2</sub>-Absorption durch NaOH und der Kombination von beiden auf die Fettsäuresynthese untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2

| Nr. | Gas-phase | Norm. | Mn <sup>++</sup> -Zusatz |     | CO <sub>2</sub> -Absorpt. |     | CO <sub>2</sub> -Abs. + Mn-Zus. |     |
|-----|-----------|-------|--------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------------|-----|
|     |           | Wert  | I/min                    | %N. | I/min                     | %N. | I/min                           | %N. |
| 347 | Argon     | 0.99  | 1.49                     | 164 | 0.31                      | 34  | 1.38                            | 152 |
| 349 | "         | 1.27  | 2.07                     | 163 | 0.67                      | 52  | 1.55                            | 122 |
| 362 | "         | 1.10  | 2.38                     | 217 | 0.93                      | 85  | 2.19                            | 200 |
| 344 | Luft      | 1.55  | 1.96                     | 127 | 0.71                      | 46  | 1.48                            | 95  |
| 453 | "         | 0.31  | 0.61                     | 195 | 0.09                      | 27  | 0.32                            | 102 |
| 455 | "         | 2.00  | 2.30                     | 115 | 0.87                      | 43  | 0.80                            | 40  |
| 457 | "         | 1.14  | 1.12                     | 98  | 0.29                      | 25  | 0.40                            | 35  |
| 458 | "         | 0.93  | 0.72                     | 77  | 0.07                      | 7   | 0.08                            | 8   |
| 459 | "         | 0.82  | 1.20                     | 145 | 0.12                      | 15  | 0.19                            | 23  |
| 460 | "         | 0.47  | 0.57                     | 121 | 0.23                      | 49  | 0.28                            | 60  |

Der Einfluß von  $Mn^{++}$ , CO<sub>2</sub>-Absorption durch NaOH und die Kombination beider auf die Fettsäuresynthese. Höhe der Fettsäuresynthese in Imp · 10<sup>4</sup>/min. Normalwert = 100 %.

Bei den anaeroben Versuchen stieg die Fettsäuresynthese unter Mn-Einfluß im Mittel auf 181 % der Kontrollen; bei CO<sub>2</sub>-Absorption wurde eine Verminderung auf durchschnittlich 57 % gefunden. Diesen Effekt konnte Mn<sup>++</sup>-Zusatz nicht nur aufheben, es zeigte sich vielmehr, daß die Steigerung der Fettsynthese durch Mn<sup>++</sup> bei gleichzeitiger CO<sub>2</sub>-Absorption anaerob nur wenig unter den Ergebnissen mit Mn<sup>++</sup>-Zusatz allein lag.

Bei den 5 verwertbaren aeroben Versuchsreihen ergab Mn<sup>++</sup> eine mittlere Aktivitätssteigerung von 141 %, CO<sub>2</sub>-Absorption bewirkte eine Verminderung des Acetateinbaus auf 36 % der Norm und die Kombination von beiden brachte eine durchschnittliche Ausbeute an höheren Fettsäuren von 64 % der Kontrollen. Unter aeroben Verhältnissen war also die Wirkung der Mn<sup>++</sup>-Einsaat geringer, die Wirkung der CO<sub>2</sub>-Absorption stärker, als unter anaeroben Vergleichsbedingungen.

Das nach Abschluß der Inkubation entnommene Natriumbicarbonat erwies sich immer als stark radioaktiv.

### Der Einfluß von Mn<sup>++</sup> auf die CO<sub>2</sub>-Entstehung

Die bisher mitgeteilten Ergebnisse führten zu der Frage, ob und inwieweit sich die Mn<sup>++</sup>-Wirkung auf die Fettsäuresynthese auch manometrisch, das heißt in einer Änderung der abgegebenen Menge CO<sub>2</sub> zeigen läßt.

In 5 Versuchen wurde die CO<sub>2</sub>-Abgabe aus der Reaktionslösung mit und ohne Mn<sup>++</sup>-Zusatz während der Inkubation manometrisch bestimmt (Tabelle 3). Nach dreistündiger Inkubation war in allen Versuchsansätzen, denen Mn<sup>++</sup> zugesetzt worden war, wesentlich weniger CO<sub>2</sub> frei geworden, die manometrisch bestimmte Gaszunahme unter Mn<sup>++</sup>-Einfluß betrug im Mittel nur 1/4 der Vergleichswerte.

Tabelle 3

| Kontrolle | Mn <sup>++</sup> -Zusatz |
|-----------|--------------------------|
| 10.05     | 3.00                     |
| 6.75      | 2.10                     |
| 13.30     | 4.35                     |
| 6.75      | 1.50                     |
| 5.70      | 3.90                     |

CO<sub>2</sub>-Abgabe unter Einfluß von Mn<sup>++</sup> .  
Werte in  $\mu$ l.

## CO<sub>2</sub>-Begasung und Fettsäuresynthese

Ergab die Verminderung des CO<sub>2</sub>-Druckes in der Reaktionslösung durch Absorption von CO<sub>2</sub> an NaOH eine Verringerung der Fettsäuresynthese und zeigte sich andererseits bei Zusatz von Mn<sup>++</sup> eine Erhöhung des Acetateinbaus bei gleichzeitiger Senkung der CO<sub>2</sub>-Abgabe, so war nun zu untersuchen, inwieweit sich eine Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Druckes auf die Fettsäuresynthese auswirkt.

In 20 Versuchen wurde die Höhe der Fettsäuresynthese unter CO<sub>2</sub>-Begasung gemessen, in 9 Versuchen gleichzeitig die Wirkung von Mn<sup>++</sup> und von CO<sub>2</sub>-Begasung + Mn<sup>++</sup>-Einsaat beobachtet (Tabelle 4). Mit Ausnahme

Tabelle 4

| Nr.     | Norm. | Mn <sup>++</sup> - |     | CO <sub>2</sub> - |     | CO <sub>2</sub> -Beg. |     |
|---------|-------|--------------------|-----|-------------------|-----|-----------------------|-----|
|         | Wert  | Zusatz             |     | Begasung          |     | + Mn-Zus.             |     |
|         | I/min | I/min              | %N. | I/min             | %N. | I/min                 | %N. |
| 416     | 0.10  | -                  | -   | 0.22              | 220 | -                     | -   |
| 425A 1) | 0.18  | -                  | -   | 0.38              | 214 | -                     | -   |
| 426A    | 0.25  | 0.60               | 243 | 0.39              | 156 | 1.08                  | 436 |
| 453     | 0.31  | 0.61               | 195 | 1.43              | 457 | 2.26                  | 722 |
| 424A    | 0.64  | 0.98               | 214 | 0.37              | 81  | 1.18                  | 257 |
| 443     | 0.76  | -                  | -   | 2.86              | 375 | -                     | -   |
| 465     | 0.78  | -                  | -   | 2.14              | 275 | -                     | -   |
| 431A    | 0.89  | -                  | -   | 2.06              | 231 | -                     | -   |
| 458     | 0.93  | 0.72               | 77  | 2.16              | 232 | 2.10                  | 225 |
| 418A    | 1.05  | -                  | -   | 1.71              | 164 | -                     | -   |
| 450     | 1.10  | -                  | -   | 2.26              | 206 | -                     | -   |
| 457     | 1.14  | 1.12               | 98  | 1.17              | 103 | 2.47                  | 216 |
| 443     | 1.17  | -                  | -   | 2.85              | 243 | -                     | -   |
| 438A    | 1.30  | 2.02               | 155 | 2.74              | 211 | 4.03                  | 308 |
| 445     | 1.58  | 2.00               | 126 | 3.32              | 209 | 4.44                  | 279 |
| 423A    | 2.45  | 4.79               | 196 | 1.47              | 60  | 4.67                  | 191 |
| 462     | 2.64  | -                  | -   | 3.68              | 138 | -                     | -   |
| 422A    | 2.83  | -                  | -   | 2.16              | 77  | -                     | -   |
| 471     | 3.22  | -                  | -   | 4.24              | 132 | -                     | -   |
| 430A    | 3.52  | 2.93               | 83  | 3.72              | 106 | 6.17                  | 175 |

Einfluß der CO<sub>2</sub>-Begasung auf die Höhe der Fettsäuresynthese.

Werte in Imp · 10<sup>4</sup>/min. Normalwert = 100 %.

1) die Normalwerte der mit A bezeichneten Versuche wurden bei anaerober Inkubation erzielt.

von 3 Versuchen, die außerhalb der besprochenen Vergleichsnorm liegen, ließ sich in allen Fällen durch  $\text{CO}_2$ -Begasung eine Erhöhung der Ausbeute an synthetisierten höheren Fettsäuren erzielen, über die Hälfte der Versuche ergab eine Aktivitätssteigerung zwischen 100 und 200 %. Die Kombination von  $\text{CO}_2$ -Begasung und  $\text{Mn}^{++}$ -Zusatz ließ immer die Fettsäuresynthese noch über die vergleichbaren Resultate mit  $\text{CO}_2$ -Begasung bzw.  $\text{Mn}^{++}$ -Einsaat allein ansteigen. Auch Versuchsansätze, deren Ausgangsaktivitäten weit über der Normgrenze von  $1.5 \cdot 10^4$  Imp/min lagen, und bei denen  $\text{Mn}^{++}$  keinen oder nur einen sehr geringen Einfluß zeigte, wurden vielfach durch die Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Drucks noch beträchtlich aktiviert. Das gleiche gilt bei diesen Versuchen in verstärktem Maße für die zusätzliche  $\text{Mn}^{++}$ -Einsaat zur  $\text{CO}_2$ -Begasung.

Zur Klärung der Frage, inwieweit in unserem System der direkte Einbau von  $\text{CO}_2$  in höhere Fettsäuren in Betracht zu ziehen ist, wurde in 4 Versuchen, bei denen inaktives Acetat eingesetzt worden war, eine Begasung mit  $^{14}\text{CO}_2$  vorgenommen.

Es ließ sich in allen Fällen nur eine minimale, selbst im Methandurchflußzähler kaum erfaßbare Radioaktivität der synthetisierten Fettsäuren feststellen.

## 2. Das Verhalten der Fettsäuresynthese und des ATP-Spiegels im Verlauf der dreistündigen Inkubation

Die bisher erzielten Ergebnisse ließen annehmen, daß die Auswirkungen einer Veränderung des  $\text{CO}_2$ -Druckes im Reaktionsgemisch nicht durch eine direkte und isolierte Beeinflussung des Fettstoffwechsels zu erklären seien, sondern ihren Ursprung in einer Änderung der gesamten Stoffwechsellage haben könnten.

Zur Prüfung dieser Vorstellung erschien ATP, als wichtigste Energiequelle im Stoffwechsel und als wesentliches Verbindungsglied zwischen Atmung, Glykolyse und Fettsäuresynthese am geeignetsten, als Ausdruck für die Gesamtstoffwechsellage des inkubierten Systems untersucht zu werden. Dabei war von vornherein der absoluten Höhe des ATP-Gehalts an sich weniger Bedeutung beizumessen, als dem Verhalten des ATP-Spiegels im Verlauf der dreistündigen Inkubation jeweils unter verschiedenen Bedingungen.

# Fettsäuresynthese und ATP-Spiegel bei $Mn^{++}$ -Zusatz

Zunächst wurden in 4 Versuchsreihen unter aeroben Bedingungen die Höhe der Fettsäuresynthese und des ATP-Gehalts mit und ohne  $Mn^{++}$ -Einsatz jeweils vor Beginn, nach 10, 20, 40, 80, 120 und 180 min Inkubationsdauer gemessen. Wie aus Tabelle 5 (Abb. 1, S. 19) hervorgeht, steigt die Fettsäuresynthese in beiden Vergleichsreihen innerhalb der ersten 40 Minuten am stärksten an, wobei sich der  $Mn^{++}$ -Einfluß von Anfang an sehr deutlich verfolgen läßt. Mit dem 80-Minuten-Wert ist im allgemeinen in beiden Fällen das Maximum der Fettsäuresynthese annähernd erreicht.

Tabelle 5

| Zeit  |                        | 0    |      | 10   |      | 20   |      | 40   |      | 80   |        | 180 min |  |
|-------|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|---------|--|
| Nr.   |                        | ATP  | Fett | ATP  | Fett | ATP  | Fett | ATP  | Fett | ATP  | Fett   | ATP     |  |
| ===== |                        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |        |         |  |
| 463   | Normans.               | 1.71 | 0.77 | 1.15 | 0.81 | 0.53 | 1.03 | 0.71 | 1.82 | 1.27 | 1.68   | 0.03    |  |
|       | Mn <sup>++</sup> -Zus. | "    | 1.30 | 0.70 | 1.10 | 0.25 | 2.69 | 0.40 | 2.07 | 0.62 | 2.94   | 0.03    |  |
| 467   | Normans.               | 1.28 | 0.44 | 0.88 | 0.53 | 0.50 | 0.57 | 0.19 | 0.86 | 0.19 | 0.97   | 0.06    |  |
|       | Mn <sup>++</sup> -Zus. | "    | 0.90 | 0.34 | 1.08 | 0.13 | 1.56 | 0.00 | 1.64 | 0.00 | 1.82   | 0.00    |  |
|       | Zeit                   | 0    | 20   |      | 40   |      | 80   |      | 120  |      | 180min |         |  |
| 469   | Normans.               | 0.70 | 1.26 | 0.25 | 1.51 | 0.06 | 1.60 | 0.00 | 1.60 | 0.00 | 1.42   | 0.00    |  |
|       | Mn <sup>++</sup> -Zus. | "    | 2.33 | 0.19 | 3.29 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 3.46 | 0.00 | 3.92   | 0.00    |  |

Fettsäuresynthese und ATP-Spiegel bei  $Mn^{++}$ -Zusatz in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Werte der Fettsynthese in  $\text{Imp} \cdot 10^4/\text{min}$ , ATP-Werte in  $\mu\text{g}/\text{ml} \times 10^2$ .

Entsprechend fällt der ATP-Gehalt im Normalversuch während der ersten 40 Minuten ziemlich rasch und nimmt danach, je nach dem bis zu welchem Grad die Fettsynthese zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen ist, nur noch gering ab. Demgegenüber ergibt sich bei  $Mn^{++}$ -Zusatz ein noch stärkerer Abfall des ATP-Spiegels, in zwei Versuchen ist schon nach 40 Minuten alles ATP verbraucht, im dritten Versuch liegen die Werte alle unter den vergleichbaren Werten ohne  $Mn^{++}$ -Einsatz.

Nach dieser grundsätzlichen Orientierung über das Verhalten der Fettsäuresynthese und des ATP-Spiegels im Verlauf der Inkubation wurden dieselben Messungen unter CO<sub>2</sub>-Begasung durchgeführt.

### Fettsäuresynthese und ATP-Spiegel bei CO<sub>2</sub>-Begasung

Drei Versuche sollten zunächst Aufschluß über die Höhe der Fettsäuresynthese bzw. über die ATP-Konzentration nach jeweils 10, 20, 40, 80, 120 und 180 Minuten Inkubationsdauer bei CO<sub>2</sub>-Begasung erbringen, in drei weiteren Reihen wurden die Auswirkungen einer zusätzlichen Mn<sup>++</sup>-Begasung beobachtet.

Tabelle 6 zeigt die einzelnen Ergebnisse der Versuche mit CO<sub>2</sub>-Begasung, Abb. 2 (s. 19 ) eine Idealkurve der Werte.

Tabelle 6

| Zeit |                       | 0    | 10'  |      | 20'  |      | 40'  |      | 80'  |      | 180min |      |
|------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|------|
| Nr.  |                       | ATP  | Fett | ATP  | Fett | ATP  | Fett | ATP  | Fett | ATP  | Fett   | ATP  |
| 462  | Normans.              | 1.58 | 0.74 | 1.30 | 1.19 | 0.96 | 1.58 | 0.85 | 2.17 | 0.73 | 2.64   | 0.00 |
|      | CO <sub>2</sub> -Beg. | "    | 1.67 | 1.26 | 2.52 | 0.58 | 3.19 | 0.52 | 3.72 | 0.25 | 3.69   | 0.00 |
| 465  | Normans.              | 1.35 | 0.94 | 1.00 |      | 0.68 | 0.72 | 0.44 |      | 0.00 | 0.78   | 0.00 |
|      | CO <sub>2</sub> -Beg. | "    | 1.09 | 0.98 | 1.94 | 0.43 | 1.67 | 0.00 | 2.14 | 0.00 |        | 0.00 |
| Zeit |                       | 0    | 20'  |      | 40'  |      | 80'  |      | 120' |      | 180min |      |
| 471  | Normans.              | 0.70 | 1.37 | 0.83 | 1.53 | 0.61 | 2.42 | 0.43 | 2.74 | 0.00 | 3.22   | 0.00 |
|      | CO <sub>2</sub> -Beg. | "    | 2.33 | 0.80 | 3.60 | 0.37 | 4.18 | 0.00 | 4.28 | 0.00 | 4.28   | 0.00 |

Fettsäuresynthese und ATP-Spiegel bei CO<sub>2</sub>-Begasung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Werte der Fettsäuresynthese in Imp · 10<sup>4</sup>/min. ATP-Werte in  $\mu$  · 10<sup>2</sup>/ml.

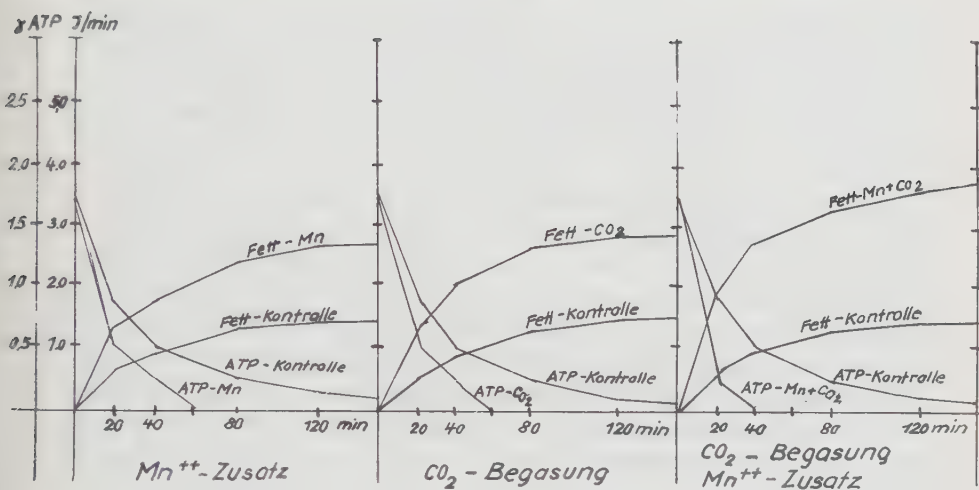
Die erzielten Ergebnisse lassen weder im Verlauf der Fettsynthese-Kurve, noch der ATP-Kurve gegenüber den Resultaten mit Mn<sup>++</sup>-Zusatz einen grundsätzlichen Unterschied erkennen. Auch unter CO<sub>2</sub>-Begasung fällt der ATP-Spiegel deutlich rascher ab, als in der Vergleichsserie, die Werte der Fettsynthese übersteigen von Anfang an die Kontrollwerte weit.



Abb. 1

Abb. 2

Abb. 3



Abbildungen 1, 2 und 3:

Fettsäuresynthese und ATP-Spiegel in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Werte der Fettsynthese in Imp  $\cdot 10^4$ /min, ATP-Werte in  $\mu$   $\cdot 10^2$ /ml.

#### IV. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ein in Anlehnung an die Angaben von Brady und Gurin (10) praepariertes zellfreies Enzymsystem aus Taubenleber - es enthält neben den Fermenten der Fettsynthese auch die der Atmung und der Glykolyse - war in unseren Versuchen in der Lage, eingesetztes  $^{14}\text{C}$ -Acetat unter aeroben wie anaeroben Verhältnissen in höhere Fettsäuren einzubauen.

Zugabe von  $\text{Mn}^{++}$  in der optimalen Konzentration von  $0.338 \cdot 10^{-3}\text{m}$  konnte die Fettsäuresynthese stark erhöhen. Bei Vergleichswerten von  $0.5 - 1.5 \cdot 10^4$  Imp/min lag die prozentuale Mn-Steigerung ziemlich konstant zwischen 70 und 100 %, so daß Enzymsysteme, die diese beiden Bedingungen erfüllten, am ehesten auch quantitativ untereinander vergleichbar erschienen. Interessant für die Betrachtung der weiteren Ergebnisse ist ferner die Beobachtung, daß sich die Mn-Wirkung auf die Fettsäuresynthese auch in einer gleichzeitigen Verminderung der Menge an freiwerdenden  $\text{CO}_2$  manometrisch verfolgen ließ.

Die durch Absorption von  $\text{CO}_2$  an NaOH erzielte Verringerung des  $\text{CO}_2$ -Drucks in der Testlösung ließ in allen Versuchen, aerob wie anaerob die Fettsynthese stark abfallen, und zwar bei Begasung mit Luft noch stärker, als mit Argon. Ebenso war bei diesen Versuchen die  $\text{Mn}^{++}$ -Einsaat aerob weniger wirksam als anaerob.

Die Steigerung des  $\text{CO}_2$ -Druckes im Reaktionsgemisch durch  $\text{CO}_2$ -Begasung vor Inkubation hatte eine beträchtliche Erhöhung der Einbaurate von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in höhere Fettsäuren zur Folge, während ein direkter Einbau von  $^{14}\text{CO}_2$  nur in ganz minimalem Umfang nachgewiesen werden konnte.

$\text{Mn}^{++}$  war in allen Fällen in der Lage, den Effekt der  $\text{CO}_2$ -Begasung noch zu verstärken.

Die Messungen der Fettsäuresynthese und des ATP-Gehalts während der dreistündigen Inkubation ergaben für die Kontrollen einen zunächst steilen und nach 40 Minuten immer flacher werdenden Anstieg der Fettsynthese, während der ATP-Spiegel zu Anfang rascher, später weniger schnell sank. Die Zugabe von  $\text{Mn}^{++}$  und ebenso die  $\text{CO}_2$ -Begasung veränderten die Normverlaufskurven nur qualitativ, das heißt, sowohl die Zunahme der Fettsäuresynthese als auch der Abfall des ATP-Spiegels erfolgten in beiden Fällen wesentlich rascher. Den stärksten Einfluß in diesem Sinne zeigte die Kombination von  $\text{CO}_2$ -Begasung und  $\text{Mn}^{++}$ -Einsaat.

Es finden sich in der neueren Literatur einige Hinweise auf ähnliche Beobachtungen, wie sie hier unter Veränderung des  $\text{CO}_2$ -Drucks beschrieben wurden.

Zunächst muß die Tatsache erwähnt werden, daß Brady und Gurin für die Versuche zur Fettsäuresynthese mit Hilfe eines aus Taubenleber gewonnenen Enzymsystems die Verwendung eines bicarbonathaltigen Phosphatpuffers vorschreiben, ohne dies allerdings näher zu begründen (10). Porter, Wakil et al. (13) wiesen dann erstmals 1957 auf einen absoluten Bedarf an Bicarbonat für die Fettsynthese mit einem gereinigten Fermentsystem aus Taubenleber hin, wobei das in diesem System sonst unentbehrliche Isozitrat durch  $\alpha$ -Ketoglutar säure, TPNH und Bicarbonat voll ersetzt werden konnte. In einer weiteren Mitteilung wurde gezeigt, daß die Höhe der Fettsäuresynthese von der Bicarbonatkonzentration direkt abhängig ist, daß  $^{14}\text{CO}_2$  aber nicht in höhere Fettsäuren eingebaut wird (14). Nach neuesten Ergebnissen von Wakil und Ganguly (20) scheint allerdings doch ein direkter Effekt von  $\text{CO}_2$  auf die Fettsäuresynthese möglich. Es gelang diesen Autoren mit Hilfe der Biotin-haltigen Fraktion ihres Fermentsystems aus Acetyl-CoA unter Zusatz von  $\text{Mn}^{++}$ , ATP und  $\text{HCO}_3^-$  ein Zwischenprodukt des Fettsäurestoffwechsels darzustellen, das sich mit Malonyl-CoA identifizieren ließ, in dem zwei C-Atome aus dem Acetyl-CoA, ein C-Atom aus dem Bicarbonat stammten. Bei Untersuchungen mit einem System, das zu Atmung, Glykolyse und Fettsynthese befähigt war, stellten Müller und Cooper (15) fest, daß die Fettsäuresynthese bei Inkubation mit geöffneten Trögen um ein vielfaches geringer war als mit geschlossenem System und führten diese Beobachtung in Übereinstimmung mit unserer Annahme auf die ungehinderte  $\text{CO}_2$ -Abgabe aus der inkubierten Lösung zurück. Allerdings konnten sie durch Füllung der Tröge über der Testlösung mit reiner  $\text{CO}_2$  keine Steigerung des Acetateinbaus in höhere Fettsäuren erzielen, während sie eine deutliche Erhöhung der Fettsynthese durch eine Füllung mit 88 %  $\text{O}_2$  + 12 %  $\text{CO}_2$  erreichten.

Wenn auch diese Mitteilung in vielem von unseren Beobachtungen abweichen, so darf doch zunächst bejaht werden, daß sich nicht nur eine Veränderung der  $\text{O}_2$ -Verhältnisse, sondern auch eine Verminderung oder Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Drucks auf den Intermediärstoffwechsel auswirkt. Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Untersuchung der Fettsäuresynthese nur ein Teilgebiet des Gesamtstoffwechsels erfaßt, es darf aber nach den einleitend besprochenen Tatsachen angenommen werden, daß

die Veränderung des  $\text{CO}_2$ -Drucks sich zumindest nicht nur auf den Fettstoffwechsel auswirkt. Die Tatsache, daß die Begasung mit  $^{14}\text{CO}_2$  keine nennenswerte Aktivität der synthetisierten Fettsäuren erbrachte und die Überlegung, daß sich eine Begasung mit inaktivem  $\text{CO}_2$  - wandelte es sich um einen  $\text{CO}_2$ -Einbau in Fettsäuren - im Geigerzähler nicht bemerkbar machen könnte, würden darüber hinaus für die Annahme sprechen, daß der Ansatzpunkt für die  $\text{CO}_2$ -Wirkung nicht bei der Fettsäuresynthese, sondern an einer anderen Stelle des Intermediärstoffwechsels zu suchen sei.

Bei unserem Fermentsystem, in dem Atmung, Glykolyse und Fettsynthese ablaufen können, dürften alle Reaktionen, bei denen carboxyliert oder decarboxyliert wird, durch Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Drucks in ihrem physiologischen Gleichgewicht gestört werden. Die Carboxylierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Isozitronensäure (Ochoa (17)), die in dem gereinigten Fermentsystem von Porter und Wakil (13) nach deren Ansicht bei Zugabe von Bicarbonat stattfindet und somit eine Fettsynthese erst ermöglicht, wäre auch hier denkbar und bei  $\text{CO}_2$ -Begasung durchaus anzunehmen. Es erscheint allerdings - zumindestens im Falle einer  $\text{CO}_2$ -Begasung - unwahrscheinlich, daß die den Zitronensäurezyklus anregende Wirkung der Isozitronensäure für die Steigerung der Fettsäureausbeute verantwortlich ist; denn es ist nicht vorstellbar, daß der Zitronensäurezyklus gegen einen erhöhten  $\text{CO}_2$ -Druck noch normal ablaufen kann. Vielmehr ist damit zu rechnen, daß hierbei die beiden, im Zyklus erfolgenden Decarboxylierungen, durch die letztlich Acetat zu  $2 \times \text{CO}_2$  abgebaut wird, unterbunden oder wenigstens behindert werden. Diese Blockierung im Abbau des Acetats hat zur Folge, daß alles dem Testansatz zugeführte Acetat für Aufbaureaktionen, also auch für die Fettsäuresynthese zur Verfügung bleibt, d.h. es ist ein verstärkter Druck in Richtung Synthese zu erwarten. Als weitere Folge der Hemmung des Zitronensäurezyklus würden der Glykolyse vermehrt dehydrierte PN angeboten, was nach Angaben von v. Brand und Helmreich (8) zu einer Anregung des glykolytischen Zuckerabbaus und damit wieder der Fettsäuresynthese führt.

Daß die Wirkung der  $\text{CO}_2$ -Begasung bei den Versuchen mit anaeroben Kontrollansätzen prozentual geringer ist, als bei aeroben Kontrollen, liegt daran, daß die Anoxybiose an sich schon über eine vermehrte Glykolyse die Fettsäuresynthese anhebt (8). Da ein Versuchsansatz, der mit  $\text{CO}_2$  begast wird, damit gleichzeitig unter anaeroben Bedingungen gerät, läßt sich die eigentliche  $\text{CO}_2$ -Wirkung nur im Vergleich gegen ebenfalls anaerob inkubierte Kontrollen ermitteln.

Die Ergebnisse von Wakil und Ganguly (20) und Arbeiten aus dem Lynen'schen Institut über die Carboxylierung von Dimethylacryl-CoA zu HMG-CoA (18) stehen zu dem oben ausgeführten in einem gewissen Gegensatz. Sie zwingen zu einer Revidierung und Erweiterung des Standpunkts insofern, als aus ihnen hervorgeht, daß es neben dem von Lynen beschriebenen Fettsäurezyklus auch andere Wege zur Synthese höherer Fettsäuren geben muß. Dabei scheint vor allem der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, wie sie Wakil und Ganguly nachweisen konnten, besondere Bedeutung beizukommen, denn da die von diesen Autoren mitgeteilte Steigerung der Fettsäureausbeute unter Verwendung von inaktivem Bicarbonat erzielt wurde, muß angenommen werden, daß eine Addierung von Acetyl-CoA an Malonyl-CoA und damit eine weitere Verlängerung der Fettsäurekette leichter stattfindet, als der Fettsäureaufbau über die Kondensierung von zwei Molekülen Acetyl-CoA im Lynen-Cyclus.

Entsprechend der Vorstellung, daß durch eine Verminderung von Decarboxylierungsreaktionen und durch eine Erleichterung von Carboxylierungen im Intermediärstoffwechsel die Fettsäuresynthese angeregt wird, muß eine Senkung des  $\text{CO}_2$ -Drucks durch Absorption der freiwerdenden  $\text{CO}_2$  an NaOH das Gleichgewicht dieser Reaktionen in Richtung Decarboxylierung verschieben, d. h. den Umsatz im Zitronensäurezyklus steigern und die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA erschweren oder ganz unterbinden. Die starke Einschränkung der Fettsäuresynthese, wie sie in unseren Versuchen durch  $\text{CO}_2$ -Absorption erreicht wurde, wäre somit daraus zu erklären, daß das  $^{14}\text{C}$ -Acetat in den energetisch viel günstigeren Zitronensäurezyklus vermehrt eingeschleußt wird und damit umgekehrt natürlich der Druck in Richtung Fettsynthese sinkt. Dazu kommt es unter aeroben Bedingungen als Folge des erhöhten Umsatzes im Zitronensäurezyklus zu einer Verstärkung der Atmung und auf Grund des Pasteureffektes zu einer Einschränkung der Glykolyse, was ein Absinken des DPNH- bzw. TPNH-Angebots an den Fettsäurezyklus und damit ein Absinken der Fettsäuresynthese nach sich zieht. Daß anaerob, wie die Ergebnisse zeigen, die Fettsynthese durch  $\text{CO}_2$ -Absorption nicht im selben Maß beeinträchtigt wird, wie aerob, könnte diese Vorstellung bestätigen.

Eine Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA erscheint bei ständiger Absorption von  $\text{CO}_2$  kaum wahrscheinlich, sie wird zumindest ver-

langsam sein, so daß auch der Ausfall dieses Syntheseweges als wesentliche Ursache für die Fettsyntheseminderung angesehen werden könnte. Die Tatsache, daß bei der  $\text{CO}_2$ -Absorption gewonnenes Natriumbicarbonat immer eine starke Radioaktivität aufwies, spricht allerdings wieder für die Annahme eines starken Abbaus von  $^{14}\text{C}$ -Acetat im Zitronensäurezyklus. In welchem Maß nun der eine oder der andere Weg für die Beeinflussung der Fettsäuresynthese verantwortlich zu machen ist, muß vorläufig offen bleiben.

Auch die Ergebnisse der  $\text{Mn}^{++}$ -Wirkung lassen sich in beiden Fällen sinnvoll einordnen, da sowohl die Reaktion von Ochoa (17) als auch die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA  $\text{Mn}^{++}$  in katalytischen Mengen benötigt. Da  $\text{Mn}^{++}$  aber noch an einer Vielzahl anderer Reaktionen im Intermediärstoffwechsel als Katalysator beteiligt ist, erscheint es unmöglich, aus seiner Wirkung hier genauere Schlüsse zu ziehen. Eine ausführliche Zusammenstellung der einschlägigen Literatur findet sich in der Arbeit von Völkl (12).

Der in unseren Versuchen jeweils erfaßte ATP-Gehalt ist als Differenz von ATP-Bildung und ATP-Verbrauch in der inkubierten Lösung anzusehen. Bei den hier grundsätzlich aerob verlaufenden Kontrollversuchen dürfte der Atmungskettenphosphorylierung die größte Bedeutung für den ATP-Aufbau beigemessen werden, während die Fettsäuresynthese, oder genauer die "Aktivierung" des eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA als stark endergonischer Vorgang den wesentlichen Teil des ATP-Verbrauchs ausmachen wird. So war für die Normalversuche durchaus zu erwarten, daß mit zunehmender Fettsynthese der ATP-Spiegel sinkt. Da aber Zugabe von ATP in ein fettsynthetisierendes Fermentsystem zu einer Erhöhung der Fettsäureausbeute führt (8), war weder für die  $\text{Mn}^{++}$ -Einsaat, noch für die  $\text{CO}_2$ -Begasung von vornherein zu entscheiden, ob ihre Wirkung auf die Fettsäuresynthese über eine Erhöhung des ATP-Angebots zustande käme, oder unabhängig davon.

Die ATP-Verlaufskurven bei  $\text{Mn}^{++}$ -Zusatz zeigen bei gesteigerter Fettsäuresynthese ein gegenüber den Kontrollen rascheres Abfallen des ATP-Spiegels. Es muß allerdings offen bleiben, ob nicht trotzdem mehr ATP produziert wird ( $\text{Mn}^{++}$  als Coferment der Atmungskettenphosphorylierung; Ernster et al. (19) ) und ob nicht durch einen noch größeren Menrverbrauch sich diese Resultierende ergibt. Ebenso wie bei den Versuchen mit  $\text{CO}_2$ -Begasung, bei denen sich der ATP-Spiegel im Verlauf der dreistündigen Inkubation grundsätzlich genauso verhält, wie bei  $\text{Mn}^{++}$ -Einsaat, scheint

es aber wahrscheinlicher, daß der vermehrte ATP-Verbrauch, besser das Absinken des ATP-Spiegels als direkte Funktion der erhöhten Fettsäuresynthese aufzufassen ist. Dies darf auch deshalb angenommen werden, da ein Vergleich der ATP-Kurven bei  $Mn^{++}$ -Zusatz auf der einen und bei  $CO_2$ -Begasung auf der anderen Seite zeigt, daß die laufende ATP-Bildung, die aerob zum größten Teil auf der Atmungskettenphosphorylierung beruht, unter  $CO_2$ -Atmosphäre, also anaerob, auf Grund der gesteigerten Glykolyse die aeroben Werte erreicht.

Eine eindeutige Erklärung für die Wirkung einer Veränderung des  $CO_2$ -Drucks auf Fettsynthese und Gesamtstoffwechsel in vitro läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht geben. Dies ist umso schwieriger, als unsere Untersuchungen an einem so komplexen biologischen System durchgeführt wurden, daß sowohl die Fettsäuresynthese wie das Verhalten des ATP-Spiegels nur als Testsysteme für die gesamte Stoffwechsellage gewertet werden können, was den Aussagewert der einzelnen Ergebnisse desto mehr mindert, je mehr sie nur auf die untersuchten Gebiete bezogen werden.

Nimmt man die getestete Wirkung von  $CO_2$  als Ausdruck für die Reaktion des ganzen Intermediärstoffwechsels, so darf hier noch auf zwei Dinge hingewiesen werden:

Es war oben festgestellt worden, daß eine Verminderung des  $CO_2$ -Drucks durch Absorption der aus dem Stoffwechsel anfallenden  $CO_2$  an NaOH zu einer Senkung der Fettsäureausbeute durch Anregung des Zitronensäurezyklus und damit aerob zu einer Steigerung der Atmung führt. Es muß also in Erwägung gezogen werden, ob nicht z.B. die heute übliche Methode zur Bestimmung der Atmung eines inkubierten Systems, nach der das freiwerdende  $CO_2$  sofort an NaOH gebunden wird, als unphysiologisch anzusehen ist.

Im übrigen ist es von Interesse, noch kurz auf ein klinisch-pathologisches Bild einzugehen. Es ist seit langem bekannt, daß lokale Durchblutungsstörungen, also Zustände einer länger dauernden Hypoxie im Gewebe eines Organs, zu degenerativen Veränderungen führen, deren erste Manifestation oft eine feintropfige, diffuse Verfettung ist (20). Als Ursache für diese Erscheinung wird im allgemeinen die Verminderung der Oxydationen auf Grund des Sauerstoffmangels und damit auch eine Verminderung der Fettverbrennung angesehen (20).

In einem Gewebe, das wegen einer lokalen Durchblutungsstörung unter  $O_2$ -Mangel leidet, wird notwendigerweise auch der Abtransport der anfallenden  $CO_2$  erschwert sein, d.h. neben der Hypoxie ist hier auch eine u.U. beträchtliche Erhöhung des normalen  $CO_2$ -Drucks zu erwarten. Zwar lassen sich die in-vitro-Verhältnisse mit denen in vivo nur mit allergrößter Vorsicht vergleichen. Es könnte aber immerhin untersucht werden, ob die hier in vitro gewonnenen Ergebnisse nicht wenigstens zum Teil zur Erklärung der Beobachtungen in vivo herangezogen werden können: es ließen sich hierfür Versuche mit Leber-Gewebeschnitten denken, die während einer langandauernden Inkubation mit einem Gasgemisch von 10 %  $O_2$  und 90 %  $CO_2$  begast werden und deren histologisches Bild in gewissen Zeitabständen verfolgt wird.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Einleitend wurden einige wichtige Beziehungen zwischen Fettsynthese, Glykolyse und Atmung besprochen. Dabei wurde vor allem auf den Pasteur-Effekt und auf die Bedeutung der Entstehung von DPNH im Zuge der Triosephosphat-Dehydrierung und von TPNH im sog. Glucose-phosphate-shunt für die Fettsäuresynthese eingegangen.
2. Die Problemstellung ergab sich aus vorausgegangenen Beobachtungen, die annehmen ließen, daß Differenzen in der Höhe der in vitro-Fettsäuresynthese, die sich aus den übrigen Versuchsbedingungen nicht erklären ließen, als Auswirkungen unterschiedlicher  $CO_2$ -Drucke aufzufassen seien.
3. Als Fermentsystem zur Synthese höherer Fettsäuren aus  $^{14}C$ -Acetat wurden nach Brady und Gurin entsprechend aufgearbeitete Taubenlebern verwendet. Neben der Bestimmung der Fettsäuresynthese wurde bei einer Reihe von Versuchen auch der ATP-Gehalt im Verlauf der Inkubation gemessen.
4. Der mehrfach beschriebene fördernde Einfluß von  $Mn^{++}$  auf die Fettsäuresynthese ließ sich bestätigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß unter Wirkung von  $Mn^{++}$  um 70 % weniger  $CO_2$  aus der inkubierten Lösung freigesetzt wird, als dies normalerweise - auf Grund der ablaufenden Stoffwechselvorgänge - geschieht.

5. Verminderung des  $\text{CO}_2$ -Drucks über der inkubierten Fermentlösung führte anaerob zu einer Senkung der Fettsäure-Ausbeute auf 57 %, aerob auf 36 % der Norm, während bei Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Drucks die Werte auf bis 300 % der Norm anstiegen.
6. Die Höhe der Fettsäuresynthese im Verlauf der dreistündigen Inkubation stieg bei  $\text{Mn}^{++}$ -Zusatz wie bei Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Drucks wesentlich rascher an, als bei den Kontrollen, der ATP-Spiegel sank in beiden Fällen innerhalb der ersten 60 Minuten auf Null, während bei den Kontrollen auch nach dreiständiger Inkubation in der Regel noch geringe Mengen ATP erfaßbar waren.
7. Es wird die Möglichkeit besprochen, daß es sich bei den durch die Änderung des  $\text{CO}_2$ -Drucks erzielten Wirkungen auf die Fettsäuresynthese nicht um eine direkte Beeinflussung des intermediären Fettstoffwechsels handelt, sondern daß der eigentliche Ansatzpunkt dafür im Zitronensäurezyklus zu suchen ist, und zwar im Sinne einer Beeinflussung der Eintrittsmöglichkeit von Acetat in den Zyklus durch Hemmung bzw. Förderung der Decarboxylierung. Gleichzeitig wird auf einen anderen, grundsätzlich neuen Weg der Fettsäuresynthese eingegangen, wonach Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA carboxyliert und von da aus eine weitere Kettenverlängerung erreicht werden kann. Da die Synthese höherer Fettsäuren über diesen Weg unter Umständen leichter erfolgt, als über die Kondensierung zweier Moleküle Acetyl-CoA, können die Ergebnisse ebenso auch damit erklärt werden.
8. Eine direkte Wirkung der Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Drucks auf den ATP-Spiegel im Verlauf der Inkubation erscheint unwahrscheinlich, das rasche Absinken des ATP-Gehalts wird als direkte Funktion der schneller und höher ansteigenden Fettsäuresynthese angesehen.
9. Abschließend wird auf pathophysiologische Vorgänge hingewiesen, die mit einer lokalen Fettstoffwechselstörung einhergehen und bei denen nach den mitgeteilten Ergebnissen eine Erhöhung des physiologischen  $\text{CO}_2$ -Drucks als ursächlicher Faktor mit herangezogen werden könnte.

## VI. LITERATURNACHWEIS

1. Lipmann, F. and  
N.O. Kaplan J. of Biol. Chem. 162, 743 (1946)
2. Novelli, G.D. Federat. Proc. 12, 675 (1953)
3. Lynen, F. und  
E. Reichert Angew. Chemie 63, 47 (1951)
4. Lynen, S. and  
S. Ochoa Biochim. et Biophys. Acta 12, 299 (1953)
5. Langdon, G.R. J. of Am. Chem. Soc. 77, 3550 (1956)
6. Lynen, F. N. Ergeb. a. Chem. u. Stoffw. d.KH, S.155  
Springer-Verlag 1958
7. Helmreich, E., H. Holzer, W. Lamprecht,  
S. Goldschmidt Hoppe-Seylers Z.f.physiol. Chem. 297, 1  
(1954)
8. v. Brand, V. und  
E. Helmreich Biochem. Zeitschr. 328, 146 (1956)
9. Siperstein, M.D. and  
V.M. Fagan J. of Clinical Investig. 37, Nr. 8, 1185 u.  
1196, VIII (1958)
10. Brady, R.O. and  
S. Gurin J. of Biol. Chem. 196, 421 (1952)
11. v. Brand, V. unveröffentl. Ergebnisse
12. Völk, M. "Über den Einfluß von  $Mn^{++}$  auf die Fetts.  
Synth."  
Inaug. Diss. München 1959

13. Porter, J.W., Wakil S.J. m A. Tietz,  
M. Jacob, D. Gibson Biochim. et Biophys. Acta 25, 35 (1957)
14. Gibson D.M., E.B. Titchener,  
S.J. Wakil Biochim. et Biophys. Acta 30, 376 (1958)
15. Miller J.P. and  
J.A.D. Cooper Biochim. et Biophys. Acta 33, 436 (1959)
- 16./17. Rauen H.M. "Vergl. Biochem. Fragen" S. 132,  
Springer-Verlag 1956
18. Henning U. Dtsch. Med. Wschr. 84, Nr. 15, 760 (1959)
19. Lindberg O. and  
L. Ernster Nature (London) 17, 1038 (1954)
20. Wakil S.J. and  
J. Ganguly Fed. Proc. 18, 346 (1959)
21. Büchner, F. "Allgemeine Pathologie" 2. Aufl.  
Urban u. Schwarzenberg/ München-Berlin  
(1956)
22. Leuthardt F. Lehrbuch der Physiologischen Chemie 14. Aufl.  
Walter de Gruyter u. Co. Berlin (1959)

Für die liebenswürdige Überlassung des Themas sowie für die fördernde und anregende Teilnahme am Fortgang der Arbeit habe ich Herrn Prof. Dr. W. Seitz besonders zu danken.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. V. v. Brand, die mir die Grundlagen biochemischen Arbeitens vermittelte und unter deren ständiger Beratung und Betreuung diese Arbeit entstand.

Ebenso sei meinem Kollegen, Herrn cand. med. P. Schreier und den beiden techn. Assistentinnen Frl. I. Thöring und Frl. B. v. Kutzschenbach für die saubere und angenehme Zusammenarbeit bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten sehr herzlich gedankt.

## LEBENS LAUF

Am 15. 4. 1934 wurde ich als Sohn des Landwirts Dietrich v. Stetten und seiner Frau Evamarie v. Stetten, geb. Sittmann, in Aystetten bei Augsburg geboren.

Ab 1940 besuchte ich dort die Volksschule. Im Dezember 1945 trat ich in das humanistische Gymnasium bei St. Anna in Augsburg ein, wo ich im Juli 1953 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einem einjährigen Studium Generale am Leibniz-Kolleg der Universität Tübingen begann ich im Sommer 1954 das Medizinstudium in Tübingen, wo ich auch nach fünf Semestern, von denen ich eines in Freiburg studierte, am 1. 8. 1956 das Physikum bestand. Das klinische Studium begann ich in Freiburg, die beiden folgenden Semester hörte ich in Wien und Frankfurt/Main. Seit Sommer 1958 war ich in München immatrikuliert, wo ich im Frühjahr 1960 das Staatsexamen abgelegt habe.





